

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-502723

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)3月23日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 0 7 K 14/79		8318-4H	
A 6 1 K 38/16			
C 1 2 N 5/10			
		8314-4C	A 6 1 K 37/14
		9050-4B	C 1 2 N 15/00
			Z N A A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-505865  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)2月6日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1993)8月6日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US92/00928  
 (87) 国際公開番号 WO92/13550  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)8月20日  
 (31) 優先権主張番号 652, 869  
 (32) 優先日 1991年2月8日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP

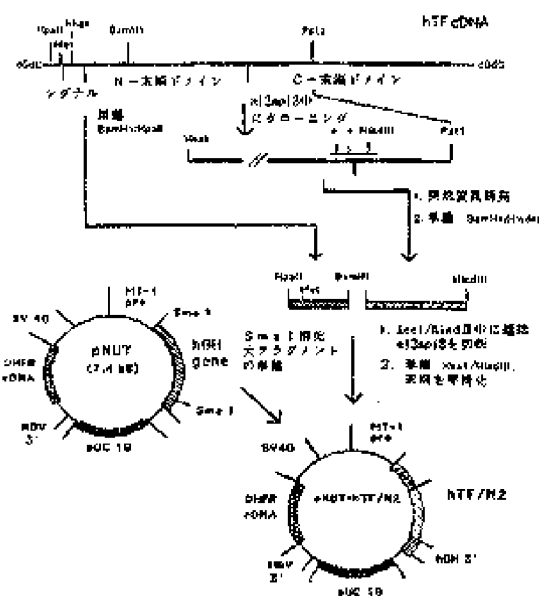
(71) 出願人 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・アンド・ステイト・アグリカルチュラル・カレッジ  
 アメリカ合衆国バーモント州05405バーリントン (番地なし)  
 (71) 出願人 ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュコロンビア  
 カナダ国ブリティッシュ・コロンビア・バンクーバー (番地なし)  
 (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及びそれらの突然変異体

## (57) 【要約】

金属-結合性が変えられた、又は他の性質を有する組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及び突然変異体トランスフェリンにつき記載する。組み替えトランスフェリン分子は組み替え分子をコードする発現ベクターを用いて形質転換されたベビーハムスター腎臓細胞などの安定な真核細胞系により機能的形態で発現される。組み替えトランスフェリンは金属の過剰負荷に苦しむ患者において過剰の毒性金属を結合して除去する金属キレート化治療に用いることができる。



## 摘 求 の 範 囲

1. 組み替えトランスフェリン。
2. 組み替えヒト血清トランスフェリン。
3. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含む、トランスフェリンの組み替え単一分子。
4. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン単一分子。
5. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン単一分子。
6. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、突然変異体の金属に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、突然変異体トランスフェリン単一分子。
7. 鉄に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、請求の範囲6に記載の突然変異体トランスフェリン単一分子。
8. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然のトランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲7に記載の突然変異体トランスフェリン単一分子。
9. トランスフェリン、又は少なくともトランスフェリンの1個の突出部の結合ドメインを含むトランスフェリン単一分子をコードする核酸を、真核細胞中の発現に用いた遺伝的調節要素と結合させて含む発現構築物を含む、真核発現ベクター。
10. 複数種類のトランスフェリン又はトランスフェリン単一分子をコードする核酸に結合したトランスフェリンシグナル配列をコードする

核酸を含む、請求の範囲9に記載の真核発現ベクター。

11. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲10に記載の真核発現ベクター。
12. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲10に記載の真核発現ベクター。
13. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲9に記載の真核発現ベクター。
14. 請求の範囲9に記載のベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞系。
15. 請求の範囲10に記載のベクターを用いてトランスフェクションされたベビーハムスター腎臓細胞系。
16. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含むトランスフェリンの組み替え単一分子を、金属の濃度を下げることによって十分な量で細胞に発現させることを含む、金属キレート化治療の方法。
17. 金属が鉄である、請求の範囲16に記載の方法。
18. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体である、請求の範囲17に記載の方法。
19. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲18に記載の方法。
20. 組み替えトランスフェリンを含む細胞培養液のための非血清培養物。

## 明 細 書

組み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、及びそれらの突然変異体

## 発明の概要

集合的にトランスフェリン又はシデロフィリンと呼ばれる鉄-結合タンパク質は、著しく類似の構造を有するタンパク質の種類を含む。ヒトラクトフェリン (Anderson, B. F. *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1769-1773) 及びウサギ血清トランスフェリン (Bailey, S. *et al.*, (1988) *Biochemistry* **27**: 5804-5812) のX-線結晶学分析は、これらのタンパク質が短いαヘリックスにより連結された2個の類似した突出部を含み、各突出部は金属イオン及び金属錯イオンのための結合部位を含む深い裂け目を形成する2個のドメインを含むことも明らかにしている。

ニワトリオボトランスフェリン遺伝子が形質転換マウス中で発現され (McKnight, G. S. *et al.*, (1983) *Cell* (Cambridge, MA) **34**: 335-341)、ラットトランスフェリンの一部とガラクトシダーゼの融合タンパク質が *Biochemistry* 中で再構成された (Aldred, A. *et al.*, (1984) *Biochemistry, Biophy. Res. Commun.* **122**: 960-968)。この融合タンパク質を除き、同様系でトランスフェリン又は分子の一部を発現する試みは不成功であった (Aldred, A. *et al.*,

(1984) *Biochemistry, Biophy. Res. Commun.* **122**: 960-968)。おそらくタンパク質の高度に回転性の構造及び分子内の多数のジスルフィド架橋がバクテリア宿主中の発現に対する主要な障害であろう。アルカリホスファターゼシグナル配列を付けてタンパク質をバクテリア発現系に向かわせることにより、天然のタンパク質の折り畳み速度を部分的に最小にする試みは不成功であった。

## 発明の要旨

本発明は組み替えトランスフェリン、少なくともトランスフェリンの1個の突出部 (アミノ-末端又はカルボキシ-末端) の金属-結合ドメインを含む組み替えトランスフェリン単一分子、及びトランスフェリンの発現のための安定な細胞培養系に関する。組み替えトランスフェリンは安定な形質転換された真核細胞、例えばベビーハムスター腎臓細胞中で発現して会-又は半-分子の形態の基本的に均一な (単分散) 飲料を与えることができる。本発明は又、天然 (野生-型) の形態のトランスフェリンと異なる金属-結合性又は他の性質を有する突然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子に関する。これらには鉄又は他の金属への結合が天然のトランスフェリンより強いことがあるいは弱いかである突然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子が含まれる。

トランスフェリン単一分子は金属調節異常症又は金属中毒にかかった患者の治療のための金属キレート化治療に適用することができる。例えばトランスフェリン単一分子、特に天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体をサラセミアなどの鉄-過剰負荷患者に投与し、その体から過剰の毒性の鉄を除去することができる。さらに半-分子又

は金属イオン選択性が変えられたその突然変異体を用いて他の毒性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅又は亜鉛を体から除去することができる。

#### 図の説明

図1はpNUTにおけるhTF/2N複製ベクターの構造を示す。ヒト血清トランスフェリンをコードする2、3-ホリのcDNAをヒト肝臓cDNAライブラリから単離し、完全アミノ末端ドメインコード配列を含む1、5-bkbのSalI/HaeIフラグメントをM13mpL8中にクローニングする。二重鎖終止コドン及びbindIII認識配列を特定部位の突然変異誘発により導入し、BamHI/HindIIIフラグメントの単離を可能にし、それがBamIII/HpaIフラグメントと結合するとアミノ末端ドメイン及びNゲル配列をコードした。このフラグメントを高複製ベクターpNUT中にターニングし、ベクターpNUT-hTF/2Nを得た。このプラスミドにおいてトランスフェリンcDNAはプロセッシングプロモーター(MT-1プロ)及びヒト癌転写停止シグナル(hGH3')の制御下であり、pNUTはヒトB型肝炎ウイルスからの転写停止シグナルを用いて組込む。cDNA(DHFR-cDNA)の発現を促進するSV40初期プロモーター(SV40)を含む。

図2は、種々のペビーハムスター腎臓細胞系からの免疫沈降物のウェスタンブロット多象。2n-誘導細胞系からの細胞ライゼート(a)及び胎児(b)の試料を同一hTF血清を用いて沈降を行な。別製したペレットの試料をNaDodSO<sub>4</sub>-PAGEにより分析し、ユトロセルロースに移し、抗-hTF抗血清及びその後アムカリホスファ

ターゼ複合抗-iggを用いて染色させた。hGH-pNUT及びhTF/2N-pNUT細胞系を500μMのMTX中で選択し、DMEM/10%ウシ胎児血清中ですべての細胞を培養した。1列、BHK細胞；2列、hGH-pNUTトランスフェクションBHK細胞；3列、hTF/2N-pNUTトランスフェクションBHK細胞。分子異性マーカ(×10<sup>3</sup>)の位置をブロットの右に示し、追加の37、400のタンパク質バンドの位置もブロットの右に示す(×37)。

図3はhTF/2Nの溶解及びPAGビ分離を示す。(パネルA)組み替えhTF/2N(上欄)及びタンパク質分解誘導hTF/2N(下欄)のPolyanion-SIのスクラム上におけるAPLC分離。

(パネルB)分子重標準(44列)及びパネルAからのピークa-dの名3列のNaDodSO<sub>4</sub>-PAGE(アクリルアミドの5-12%勾配)。(パネルC)FPLCピークa-d(組み替えhTF/2N)及びパネルAからのピークe-h(タンパク質分解誘導hTF/2N)の非還元条件下におけるウレア-PAGE。アポタンパク質(apo)及び鉄-結合タンパク質(fe)の位置を示す。APLCで用いられた条件は材料及び方法にて示す。FPLC部分は以下のように集めた：ピークa(留分23-27)、ピークb(28-31)、ピークc(32-38)、ピークd(39-45)、ピークe(28-31)、ピークf(32-36)、ピークg(38-44)及びピークh(46-51)。

図4は10mMのFe(III)(NTA)を用いた主要形態の組み替えhTF/2Nの測定を示す。タンパク質の量は1、00mLの10mM NaHCO<sub>3</sub>中の3、68A<sub>280</sub>単位であった。吸収波長経路に鉄をそれに加えた後5-10分間可視スペクトルを測定した。

図5は組み替えhTF/2Nの座標無共鳴スペクトルを示す。(a)2Hαのラインブロードニングを用いたフーリエ変換スペクトル。(b)4Hαのラインブロードニング及びDC=4、0、NS=68600における回転差スペクトル(convolution difference spectrum)。タンパク質試料は<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O中の0、1M KCl 0、1mL中で8mgであった。

図6はm-Pr-Tyr組み替えhTF/2Nの<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトルを示す。図は10Hαのラインブロードニング、NS=3、000を用いたフーリエ変換を示す。タンパク質試料は<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O中の0、1M KCl 0、1mL中で6mgであり、試料は<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O中の0、1Mの三フッ化酢酸であった。

図7はhTF/2Cコード配列の製造のためにPCRプライマーとして用いた2つの別々のオリゴヌクレオチドを示す。金カルボキシア末端のためのコード配列を含むEcoRI制限フラグメントを、25bpのPCR増幅の模範として用いた。オリゴヌクレオチド1は3'末端領域、及び天然のhTFシグナル配列をその5'末端に含む、その3'末端でhTFのアミノ酸234-241のコード配列を含む。オリゴヌクレオチド2はhTF-cDNAの3'非翻訳領域の配列を含む。この部位に第2のSmall読取配列を導入する。

#### 発明の詳細な説明

本発明は組み替えトランスフェリン、組み替えトランスフェリン単一分子、及び天然のトランスフェリン分子と比較して金属-結合能の向上など、性質が変化した金-長トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子の突然変異体を与える。組み替えトランスフェリンは大量に、及

び実質的に等質の(単分散)形態で製造することができる。例えばヒト血清トランスフェリンの組み替え単一分子は、他のヒト血清タンパク質を実質的に含まない基本的に等質の材料として製造することができる。対照的にホロタンパク質のタンパク質分解により製造された単一分子は複製が困難で、実際にヒトトランスフェリンのカルボキシー末端半分をタンパク質分解の手段により純正に製造することはできない。組み替え法は、トランスフェリンの新規形態の設計及び製造に突然変異誘発を選択することも可能にする。

一般に本発明の組み替えトランスフェリンは、トランスフェリンをコードする複製誘発物を用いて選した宿主細胞をトランスフェクションし、トランスフェクション宿主細胞を選した条件下で培養し、細胞により発現された組み替えトランスフェリンを回収することにより製造される。3種類のトランスフェリンのプライム配列が報告された(Jackson, J. M. and Chambon, P. (1982) Eur. J. Biochem. **122**: 291-295; MacGillivray, R. T. A. et al. (1983) J. Biol. Chem. **258**: 3543-3559; Meiss-Boutigues, M.-M. et al. (1984) Eur. J. Biochem. **145**: 659-676; Rose, T. M. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 1261-1265; Baldwin, G. S. and Wornatlock, J. (1988) Nucleic Acids Res. **16**: 8720-8730)。ヒト血清トランスフェリンのcDNA配列が決定された(Yang, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. S

特表平7-502723 (4)

c4. U.S.A. 8,1:2752-2756)。組み替えトランスフェリンの製造のための全一長DNA又はトランスフェリンあるいはその一部のアミノ末端又はカルボキシー末端突出部のいずれかをコードする断片DNAを、利用できる供給源から得ることができるか、又は標準的方法により原初の順序に従って合成することができる。組み替えトランスフェリンを細胞系中に分泌させるためには、トランスフェリンシグナル配列(又は発現系に属した他のシグナル配列)をコードするDNAをトランスフェリンコードDNAの上流に置く。

トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子の突然変異体を、特定部位の突然変異誘発の標準的方法により製造することができる。Taylor et al. (1985) Nuc. Acids Res. 13, 8749-8764; Zoller, M., J. and Smith, M. (1988) Meth. Enzymol. 100:458-500を参照。特に突然変異誘発を用いて天然のトランスフェリンと異なる金属結合性を有する突然変異体トランスフェリンを製造することができる。例えば、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合することができる突然変異体を製造することができる。そのような突然変異体の製造のためには、金属一結合ドメインの突然変異を誘発し、結合に含まれる1個又はそれ以上のアミノ酸を別のアミノ酸と置換する。ヒト血清トランスフェリンの場合の金属キレート配位のためのリガンドであるアミノ酸を下記に示す(アミノ酸の横の番号は一次配列中のアミノ酸残基の位置を示し、その場合成熟タンパク質の第1ペプチドを位置1と決定する)。

アミノ末突出部

カルボキシル末端突出部

鉄の酵素をコードする。これにより、トランスフェクションされた細胞を非常に高濃度(0.5mM)のメトトレキサート中で直接選択することが可能になり、ジヒドロホレートレグダーゼの不活化した受容性細胞株の必要性を廃する。pMTはpUC18誘導配列を含む、それによりpMTがE. coli中で増幅されて受容性細胞のトランスフェクションのために十分な量のプラスミドを与えることができる。

トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターは、選んだ宿主細胞中に導入される。好ましい宿主細胞は、ベクターを用いて形質転換され、遺伝的に発現のトランスフェリン構築物を発現する安定な細胞系を与えることができる真核細胞である。特に有用な細胞はベビーハムスター腎臓細胞である。ベビーハムスター腎臓細胞は、トランスフェリンをコードするDNA構築物を有するベクター(例えばpMTなど)を用いてトランスフェクションされ、遺伝的に発現のトランスフェリン(全又は単一分子)を発現し、分泌する安定な細胞培養系を与えることができる。これらの細胞は経済的な大規模生産に十分適しており、容易に利用できる供給源から得ることができる。

リン酸カルシウム共沈又はエレクトロポレーションなどの標準的方法を用い、真核宿主細胞をベクターでトランスフェクションすることができる。その後細胞を、トランスフェリンの発現を誘導するのに適した条件下で培養する。例えばpMTベクターを用いてトランスフェクションしたベビーハムスター腎臓細胞を、数週間の前夜下で刺激し、トランスフェリン構築物を発現させることができる。ベビーハムスター腎臓細胞は、細胞産物UI(raser-GM(Gibco))を約1%を含むDulbeccoの改良Eagle培養液(Ham's F-12栄養剤

(アミノ酸1-827)

(アミノ酸2-679)

アスパラギン酸	68	アスパラギン酸	392
チロシン	93	チロシン	426
チロシン	188	チロシン	519
ヒスチジン	249	ヒスチジン	584

他の種類のトランスフェリンの場合、番号が異なりリガンド(アミノ酸)は同一である。

トランスフェリンの他の誘発は鉄を制御し、これらも突然変異誘発の標的とすることができる。通常これらは近接したアミノ酸、例えばリシン、ヒスチジン又はアルギニンである。例えば天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン単一分子は、206位のリシン残基をグルタミンで置換することにより(AAG→CAG)製造することができる。

トランスフェリンコードDNAを、DNAの発現を指示するための適した調節要素を含む直接発現ベクター中にクローニングすることができる。好ましい直接発現ベクターはPamili et al. R. D. et al. (1987) Gene 56:405-448により記載されたプラスミドpMTである。このプラスミドはプロモーター領域を含む、それは重金屬及びヒト感染ホルモンの転写停止シグナルの存在下におけるトランスフェリンコードDNAの転写を含む。さらにpMTは、細胞培養物中における選択を可能にするためのヒトB型肝炎ウイルスからの転写停止シグナルと共にSV40初期プロモーターの制御下にあるジヒドロホレートレグダーゼ遺伝子を含む。遺伝子は、競争的増殖抑制メトトレキサートに対する抵抗性が270倍近い突然変異

混合物の培地中で培養するのが好ましい。

選んだ培養期間の後、細胞は、分泌されたトランスフェリンを培養液から回収することができる。標準的精製法を用いて組み替えトランスフェリンの実質的に等量の試料を得ることができる。1つの具体化の場合、培地中のトランスフェリンに鉄を結合させ、その鉄-ニオン交換クロマトグラフィーにより精製する。

本発明の組み替えトランスフェリンは、鉄又は他の過重金屬とキレート化し、体から除去するのに用いることができる。体内の鉄キレート化の通常の方法は、新生物産物の天然に存在する多様なシデロフォア及び合成鉄キレート剤を、その生理学的効果、主に鉄と結合して体から除去する能力によって評価することであった。このような化合物の多くが研究され、鉄の除去の能力は様々であり、多くの場合副作用のない作用があった(Pisli, G. C. et al. (1978) J. Pharmacol. Exp. Therap. 208:12-18)。その結果、ヒトから過剰の鉄を除去するために用いられるキレート剤として、ストレプトミセス・ピロシス(Spectromycin-pyruvate)からの誘導剤であるデフェロキサミンのみが残っている。

鉄キレート化治療に好ましいトランスフェリンは、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン単一分子である。突然変異体単一分子の初項により、金属のより有効なキレート化及び除去が可能になる。特に好ましい突然変異体単一分子は、下記の表に例示される206位であり、これは206位にリシンではなくグルタミンを含む。トランスフェリン単一分子は、ホーゲンバック質と異なる腎臓の非球状を通過し、尿中に排泄され、従って金属がキレート化さ

れるのみでなく体から除去されるので有利である。さらに原核の単一分子は細胞細胞の膜上のトランスフェリンレセプターと結合しないので、これらの細胞に結合を誘導しない。さらにヒトトランスフェリンの単一分子はおそらくヒトの体により「自己」と認識され、従って免疫学的応答を引き起こさない。

さらに突然変異体単一分子は、金属イオン選択性が異なるように設計することができる。キレート化剤を用いて他の毒性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅及び亜鉛を体から除去することができる。

キレート化治療の組合、金属をキレート化して諸悪毒の毒性濃度以下に下げるのに十分な量で組み替えトランスフェリンを患者に投与する。一般にこれは生理学的に許容し得るレベル、例えば食塩水中で、希釈口の経路で（典型的に筋筋内）投与する。

組み替え全～長ヒトトランスフェリンは、細胞培養培養のための非血清添加剤物中で使用することができる。トランスフェリンは成長細胞による鉄吸収に必要である。組み替えトランスフェリンの使用により、ヒト組織から精製したトランスフェリンに伴う汚染物（例えばHIV又は肝炎ウイルス）の感染を避けることができる。

本発明を以下の実施例によりさらに例示する。

#### 実施例

1. アミノ酸側鎖部を含む組み替えトランスフェリン単一分子の製造

#### 材料

T4 DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI（クレンワフラグメント）及びT4ポリヌクレオチドキナーゼは、Pharmacia-PL

58:8389-8394)中に描かれたヒト肝臓cDNAライブラリを、血清hTFのアミノ末端8アミノ酸をコードする合成オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成プローブとして用いてスクリーニングした。オリゴヌクレオチドはYang, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **61**:2752-2758により報告されたhTF cDNA配列のヌクレオチド88-111に相応した。オリゴヌクレオチドはす4ポリヌクレオチドキナーゼ及び<sup>32</sup>P-ATPを用いて末端一標識し (Chacones, G. and van de Sande, J. H. (1980) Methods Enzymol. **65**:76-85)、約10<sup>6</sup>個のコロニーのスクリーニングに用いた。単性のクローンの制限エンドヌクレアーゼマッピング及びDNA配列分析を、それぞれpUC19及びM13mp19ベクターを用いて補助的方法で行った (Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Messing, J. (1983) Methods Enzymol. **101**:20-78; Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467)。

発現ベクター及び細胞培養 異接発現ベクターpNUT (Palmiter, R. D. et al. (1987) Cell (Cambridge, MA) **50**:435-443) 及びペーハムスター腎臓(BHK)細胞はDr. Richard D. Palmiter (Iowa

Biochemicalsから購入した。8回ニンドスクレアーゼはPharmacia PL Biochemicals及びBethesda Research Laboratoriesから購入した。オリゴデオキシリボスクレアーゼは、Applied Biosystems 380A DNA合成機上で合成した。ヌクレオチド、Schleicher and Schuellから、<sup>32</sup>P-標識ヌクレオチドはNew England Nuclearから、ヒツジ抗-ヒトトランスフェリン抗血清はSigma Chemical Companyから、ホルマリן-固定スファロバクテリウス (*S. l. aureus*) 細胞は、Bethesda Research Laboratoriesから、プロトプロット (Protobiot) 免疫スクリーニング検出液はPromegaから、オリゴヌクレオチド-指示 (oligonucleotide-directed) 突然変異誘発キットはAmershamから、Dulbeccoの修正必須細胞及びクワン見血清はGibcoから、及び抗-ヒトトランスフェリンモノクローナル抗体hTF-14はCzechoslovakian Academy of Scienceから得た。他の試薬はすべて分析用か又はそれ以上の純度であった。

#### 方法

ヒト肝臓トランスフェリン (hTF) cDNAの単離 Dr. Stuart Orkin (Harvard University) 提供による E. coli 発現ベクターpKT-218 (Prochownik, E. V. et al. (1983) J. Biol. Chem. **2**

ed Hughes Medical Institute, University of Washington) の提供による。合成後、オリゴヌクレオチドをC<sub>18</sub>逆相カラム上で精製した (Sep-Pak, Waters Associates; Atkinson, T. and Smith, M. (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait, M. J., Ed.) pp26-81, IRL Press, Oxford)。Taylor, J. W. et al. (1985) Nucleic Acids Res. **13**:8749-8784の方法を用いることにより、特定部位の突然変異誘発を行った。プラスミドDNAは、E. coli JM105から調製し、塩化セシウム密度勾配を用いた2連続遠心分離により生成した。

BHK細胞を、10%のウシ胎児血清を含むDulbeccoの修正必須細胞 (DMEM) 中で10-cmの皿当たり約10<sup>6</sup>細胞に成長させ、続いてSearle, P. F. et al. (1985) Mol. Cell Biol. **5**:1480-1489に記載のリン酸カルシウム共沈法により10μgのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞を100μMのメトトレキサート (MTX) を含むDMEMに換え、生存細胞を500μMまで断量に選択した。いくつかの実験では800μMのMTXを直接用いて細胞を選択した。大規模の回転感染量は、100mLのDMEM-MTXを含むそれぞれ850cm<sup>2</sup>の回転感染中に約5×10<sup>6</sup>個の細胞を播種して開始した。ZnSO<sub>4</sub>を0、0.8mMの最終濃度まで培養液に加えることにより80%の濃密度にて培養物を誘導した。細胞を40時間後に収穫した。

免疫沈降及びウェスタンブロッティング 細胞培養培地及び細胞ライケートの免疫沈降を, Van Oost, B. A. et al. (1988) Biochemical Cell Biol. 54: 699-708の方法により行った。沈降物をNaDodSO<sub>4</sub>の存在下における12%ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動により分離し(Laemmli, U. K. (1970) Nature (London) 227: 680-685)、その後ニトロセルロース膜上にブロッティングした。プロットを0.1 mg/mlのゼラチンを含むPBS中でインキュベートし、その後トリツピ=β-TF抗血清(PBS中で250倍希釈)を用いて処理し、最後にアルカリホスファターゼ-置換ウサギ抗-ヒツピIgG抗体を用い、検出者の指示に従って発色した。

アミノ酸置換 3-フルオロチロシンを組み替えhTF/2N中にhTF NMRグループとして導入するため、培養培地に海塩中18%のL-チロニン濃度でD, L-メチルセロシン(Sigma Chemical Company)を添加した。細胞はD, L-メチルセロシンのない培地と同様にこの培地でも十分に成長した。

組み替えhTF/2Nの単離 収穫した培養細胞をフェニルメチルスルホニルフルオリド中で0.01%としてプロテアーゼを阻害し、培地中のトランスフェリンのすべてを凝結させるのに十分なFe(III)(NTA)<sub>3</sub>を加えた。室温で撹拌した液、溶液を冷水逆流水に対して24時間、その後Mei-Li-Q無炭酸水に対して長時間透析した。濃トリス-HCl緩衝液、pH 8.4を5 mMの最終濃度まで加え、試料を凍結して管片を凍結し、10 mMのトリス-HCl緩衝液、pH 8.4で平衡化したDCE-Sephadex (Pharmacia) のカ

ラム(2.5 x 80 cm)に負荷した。

その後カラムを同緩衝液中のNaClの濃度勾配(0-0.3 M)を用いて洗脱した。ピンク色を示す部分をNaDodSO<sub>4</sub>-PAGEにより分析し、組み替えタンパク質(Mr 37,000)を含む部分を集めた。そのような部分は、細胞培養培地中のウシ胎児血清からのラントランスフェリン及びアルブミンも含む。集めた部分をAmicon PM-10膜上で5 mLに濃縮した後、タンパク質を、100 mMの硫酸水素アンモニウムで平衡化したSephadex G-75 Superfine (Pharmacia-PL Biochemicals) のカラム(2.5 x 80 cm)上のクロマトグラフィーにかけた。

タンパク質からhTF/2Nを完全に分離するために、このカラムを通して2回目のクロマトグラフィー操作が必要な場合がある。この段階でA<sub>280</sub>/A<sub>260</sub>は通常<1.0であり、汚染ヘモグロビン(おそらくヘモグロビン)の存在を示している。hTF/2Nは、50 mMのトリス-HCl、pH 8.0中のNaClの濃度勾配(0-0.3 M)を用いたPolacryon S1 (Pharmacia) のカラム(1 x 100 cm)上で1 ml/分の流量にて1時間かけたP1.6により最終的に精製して純粋にした。1 mLの部分を集めた。タンパク質の核-結合状態に依存して2-4倍のタンパク質バンドがカラムから現れた。

5% - 12%勾配ゲルを用いてNaDodSO<sub>4</sub>-PAGEを行い、Makay, D. G. and Seal, U. S. (1978) Biochim. Biophys. Acta 452: 250-256の方法の修正版(Brown-Mason, A. and Woodworth, R. C. (1984) J. Biol. Chem. 259: 1866-1

873)に従ってウレアー-PAGEを行った。110 mLのガラスカラム(LKB)中の0-50%スクロース勾配上で0.8%のPharmalyte, pH 5-8 (Pharmacia)を用いて電気電気泳動を行った。カラムは1000 Vにて2 mAの最終電流に較て平衡中を置いた。

0.2 mL中の試料を勾配の半ばから回収した5 mLの溶液で希釈した。その後試料をカラムの等電点領域に再注入し、電圧を2分間続けた。勾配をカラムの底から1.5 mLの部分で集めた。各部分をA<sub>280</sub>及びpHに関して分析した。最高A<sub>280</sub>を有する部分を、アポ-及び核-結合タンパク質のpIを基準として選択した。

試液は、1 mMのNTA、1 mMのEDTA、0.5 Mの酢酸ナトリウムを含む緩衝液、pH 4.9中でインキュベートすることにより、核-タンパク質から容易に除去された。アポ-タンパク質をCentricon 10 (Amicon)上で最小体積に濃縮し、その後水を用いて2回、及び0.1 NのKClを用いて2回希釈して再濃縮した。アポ-タンパク質は純水中で沈殿する傾向があるが、0.1 MのKCl中に容易に溶解した。アポ-タンパク質をNaHCO<sub>3</sub>中で10 mMとし、465 nmで吸収を監視しながら薄めた濃度のpH (NTA)<sub>3</sub>で調整した。

組み替えhTF/2Nの定量的基質結合 競争的競合実験を用い、精製の得たの段階で培養液中の組み替えhTF/2Nの濃度を評価した(Foster, W. B. et al. (1982) Thromb. Res. 28: 649-661)。タンパク質分解-誘導Pc-hTF/2N(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1

980) J. Biol. Chem. 255: 708-713)をIodogen (Pierce Chemical Company)を用いて放射ヨウ素化し(Fraker, P. J. and Speck, J. G., Jr. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 849-857)、標準として用いた。モノクローナル抗-hTF抗体であるhTF-14をプローブとして用いた(Berjak, J. et al. (1984) Folia Biol. (Praha) 30: 137-140)。この抗体はhTFのアミノ末端残基部分のみを認識し(Mason, A. B. et al. (1988) Br. J. Haematol. 68: 392-393) ウシトランスフェリンを認識しない(Penhallow, R. C. et al. (1988) J. Cell. Physiol. 128: 251-260)。

アミノ-末端配列分析 組み替えhTF/2Nの非主要形質及び主要形質両方のアミノ-末端配列をUniversity of VermontのGiven Analytical FacilityにてApplied Biosystems 470A Protein Sequencer上で決定した。

過ヨウ素酸-シッフ染色 組み替えhTF/2N中のオリゴ糖の存在を、タンパク質を過ヨウ素酸-シッフ試薬で染色することにより決定した(Fairbanks, G. et al. (1971) Biochemistry 10: 2666-2677)。

核磁気共鳴スペクトル Camille and Henry Dreyfus NMR Laboratory, Department of Chemistry, University of Vermo

nt)におけるS. B7E. Teasia Braker WM NMR  
スペクトロメーターにて、4種検出 (quadralure data  
collection) を用いたフーリエ変換モードで操作してプロトン及びフッ  
素NMRスペクトルを得た。<sup>19</sup>Fプローブはその部門のDr. Chari  
asophar W. Allenにより提供された。プロトンスペクト  
ルの場合、スペクトロメーターの設定は前記の通りであった (Valic  
off, A. A. and Woodward, R. C. (1987) Biochem. J. **26**: 3120-3125)。<sup>19</sup>Fスベ  
クトルの場合、誘引結は30, 000Hzであり、アキュエジョン時間は  
0. 275秒であり、アキュエジョンは15, 01s (90°) のパル  
スの間に200μsのレシーバーゲート (receiver delay)  
が介在し、試料は300°Kであった。<sup>19</sup>F化学シフトは<sup>1</sup>H<sub>2</sub>O中の0  
1Mの三フッ化酢酸に対する。タンパク質試料は0. 1mLの0. 8  
重量% <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O中の6-8mgであり、スペクトルは<sup>1</sup>H<sub>2</sub>Oを含む検出  
5min NMR管に挿入された。1mLのクベセル中のこれらの試料  
につき測定した。<sup>19</sup>Fスベクトルの自由誘導減衰 (free indu  
ction decay) につき、フーリエ変換の前に10Hzのライ  
ンブロードニングを行った。

#### 結果

**ヒトhTF<sub>α</sub> cDNAの取得。** ハイブリッド形成プローブとしてヒト  
TF<sub>α</sub> cDNAの5' 配列への24塩基オリゴヌクレオチドを用い、ヒ  
ト胚性CD8Aライブラリ (Fracchonick, E. V. et al. **3**  
J. Biol. Chem. **258**: 8389-8394) の約100, 000倍のコロニーをスクリーニングした。1個の

性的コロニーを得た。このコロニーから抽出されたプラスミドの塩析  
(extensive) 8回篩選マッピングは、Yang, F. et al.  
**21**: 2752-2756により同一のライブラリから抽出されたヒト  
TF<sub>α</sub> cDNAから予想されたパターンと完全に一致した。このクロ  
ンの5' -及び3' -末端のDNA配列分析は、それがYang et al.  
により単離された全長クローンと同一であることを確認した。  
このcDNAの突然変異検出及びサブクローニングの際に行われるその  
他の配列分析はすべて以前に報告された配列に正確に従った。

**ベクター構築及び発現。** 2番の翻訳停止コドン及び1番のHind  
III 認識部位をhTF<sub>α</sub> cDNA配列のアミノ-及びカルボキシ末  
端ドメインの間のリンカー領域に、オリゴヌクレオチド-指示突然変異  
誘発により導入した。この構築物からの能産翻訳配列は、前述hTF  
番号付け配列に従いA55-337で終わる (MacGillivray,  
R. T. A. et al. (1983) J. Biol. Chem. **258**: 3543-3553)。

発現ベクターpNUT (Palmiter, R. D. et al. (1  
987) Cell (Cambridge, MA) **50**: 435-448) はマウスメタロチオネイン-1/ヒト成長ホルモン遺伝子融合物を含む、  
これは形質転換マウスにおいて多量のヒト成長ホルモンを指示すること  
が示された (Palmiter, R. D. et al. (1983) Science (Washington, D. C.) **222**: 809-8  
14)。このベクターの重要な機能的特徴には、マウスメタロチオネ  
イン-1プロモーターに置換後の存在下でcDNA転写を誘導させ、E.

coli 中でpUC18配列の複製及び選択を可能にし、SV40初期  
プロモーターにより誘導されたジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)  
cDNAの細胞培養物における選択を可能にすることが含まれる。DH  
FR cDNAは、競争的阻害剤メトトレキサート (MTX) に対する耐  
性61270-塩基対領域の突然変異体をコードする (Simonsen,  
C. C. and Levinson, A. D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 2495-2498)。  
これは、トランスフェクションされた細胞を非常に高濃度 (0. 5mM)  
のMTX中で培養選択することを可能にし、DHFRの不足した受容性  
細胞系の必要性を因する。

発現ベクターpNUT-hTF<sub>α</sub>/2Nの構築のために、バクテリア発  
現ベクターからBamHI-HindIIIフラグメントを単離した  
(図1)。最初のトランスフェクションcDNAクローンからの「pa」l  
-「am」iフラグメントも単離した (図1)。その後これらの2つの  
フラグメントを、AccI及びHindIIIを用いて切断したM13  
「a」8複製可能形態cDNA中に導入した。得られた結晶3ファージか  
らの複製可能形態cDNAを単離し、XbaI及びHindIIIを用い  
て切断することにより導入片を放出させ、末端を平滑末端とした。これ  
らの配列は、フラグメントが翻訳停止シグナルを含み、タンパク質のため  
の天然のシグナル配列を保持し、最初のベクター中にあるcG/cG  
配列を含まないことを保証する (図1)。このフラグメントをSmaI  
-切断pNUT中に挿入し、かくしてヒト成長ホルモン遺伝子はhTF  
/2NコードcDNAと置換されるが成長ホルモン遺伝子からの転写停  
止シグナルはそのまま残った。このプラスミドをBHK細胞中にトラン

スフェクションし、得られた形質転換体をhTXの存在下で選択した。

トランスフェクションされたBHK細胞により製造されたmRNA転  
写物の分析のために、ホルムアルデヒドの存在下のアゲロースゲル上で  
全RNAを電気泳動させた (Maniatis, T. et al. (1  
982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab  
oratory, Cold Spring Harbor, NY)。ニ  
トロセルロース上に移した後、ハイブリッド形成プローブとしてhGH  
遺伝子の3' 非翻訳領域に対するオリゴヌクレオチドを用いてブロット  
を分析した。トランスフェクションされた細胞系で約1, 4kbの誘導  
mRNAが検出されたが、細胞-感染BHK細胞では検出されなかった  
(データは示していない)。これはhGH3' 非翻訳配列及びポリ(A)  
尾部を含むhTF/2N-mRNAの推定サイズと一致した。

形質転換されたBHK細胞により製造されたポリペプチドの分析のため  
に、種々の細胞系の細胞ライセート及び溶液の両方についてウェスター  
ンブロット分析を行った (図2)。BHK細胞、hGH-pNUTプロ  
テミドを含むBHK細胞及びhTF/2N-pNUTプラスミドを含む  
BHK細胞の試料をDME (BHK細胞) 又はDMEM-MTX (p  
NUTベクターを含むBHK細胞) 中で培養した。細胞が非常に濃した  
ら細胞の試料を採取し、細胞ライセートを調製した。これらの試料を順  
にヒツジ抗-hTF抗血清及びホルマリン-固定S-アウレウス (S.  
typhimurium) 細胞と共にインキュベートした (Van Oese, B.  
A. et al. (1986) Biochem. Cell Biol. **64**: 699-705)。

特表平7-502723 (8)

NaOHとSDS)と共にインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させ、エトロセルロース膜に移すことによる結合タンパク質を分離した。その後膜をセツジ抗-hT<sub>F</sub>抗体液及びアルカリホスファターゼと複合化したウサギ抗-hT<sub>F</sub>抗体液及びアルカリホスファターゼと複合化したウサギ抗-hT<sub>F</sub>抗体液と共にインキュベートした。BHK細胞からの細胞ライセート又は培養(図2、1a列及び1b列)、あるいはhGH-hNUTプラスミドを含むBHK細胞からの細胞ライセート又は培養(図2、2a列及び2b列)を分析すると、最初のヒツジ抗-hT<sub>F</sub>抗体から予想されるヒツジ免疫グロブリンバンド(Mr = 25,000及び30,000)及び少量の交叉反応物質のみが観察された。しかしhT<sub>F</sub>/2N-hNUTプラスミドを含むBHK細胞の細胞ライセート(図2、3a列)又は培養(図2、3b列)中に、さらにMr = 37,000のバンドが観察された。このホリペプチド鎖の分子量は、アミノ酸配列から算出されたhT<sub>F</sub>/2N分子の分子量(37,838)と非常に一致している。

hT<sub>F</sub>/2N生成物の等質性は、SDS-PAGE上での細胞ライセート及び分画材料が再移動した際のシグナル配列の除去の成功を示す。沈降物中にラクトンがほとんど現れないので抗-血清はhT<sub>F</sub>鎖に特異性が高いことがわかる。

回転瓶で培養されるhT<sub>F</sub>/2N細胞系の大量培養の場合、培養中のhT<sub>F</sub>/2Nの濃度はラジオイムノアッセイにより検出して約10-15ng/mlであった。

**組み替えhT<sub>F</sub>/2Nの準備及び特性化** 組み替えhT<sub>F</sub>/2Nを3段階法により精製し、それはラジオイムノアッセイに基づいて90%の収率の主要形態のタンパク質を日常的に与える。Polyanion

SI上の最終的模型は、クレア-PAGE(図3、パネルC)により確認される通り、タンパク質の非主要成分(くさね)及び主要成分(図3、パネルA)の両方のアボ-及び統一性形態を定量的に分離した。クレア-PAGE上でも移動の遅いバンドはアボ-hT<sub>F</sub>/2Nであり、移動の速いバンドはF-hT<sub>F</sub>/2Nであることに注意してほし。SDS-PAGEゲル(図3、パネルB)は、主要形態及び非主要形態の過剰hT<sub>F</sub>/2Nが、低分子量の純分であり、主要成分がPAGE染色により脱水化物を含まない(データは示していない)ことを示した。

一般にこれらの原料は、原成のhT<sub>F</sub>/2Nより優れた単分純性を有するようである(Lineback-Zins, J. and Breck, K. (1980) J. Biol. Chem. **255**:708-713)(図3)。例えばクロマトグラフィ-のピークは前者の場合の方がより規則的であり、クレア-PAGE上のバンドの数は後者の方が多い。統一性形態のhT<sub>F</sub>/2Nの場合のスペクトル比は、典型的にA<sub>280</sub>/A<sub>435</sub>=2.1及びA<sub>435</sub>/A<sub>415</sub>=1.38であり、これはヒト前体から分離された純粋なトランスフェリンニ株の場合に等しい。F-hT<sub>F</sub>/2Nを用いたアボ-タンパク質の3.68A<sub>280</sub>単位の測定は、E<sub>435</sub>/M=2.1に相当する原料を導き、アボ-タンパク質のE<sub>435</sub>/M=38.8を示し(図4)、両方共、hT<sub>F</sub>/2N分子として合理的な値である(Lineback-Zins, J. and Breck, K. (1980) J. Biol. Chem. **255**:708-713; Zink, G. et al. (1983) Biochim. Biophys. Acta **742**:490-493)。アボ-及びF-h

組み替え hT<sub>F</sub>/2N (非主要)

組み替えhT<sub>F</sub>/2N配列は、Applied Biosystems 470Aタンパク質シーケンサー上で決定した。約2000モルの各試料を分析した。712シーケンサーサイクルを分析した。7サイクルで残基は決定されなかった。しかし分析の前にシステイン残基は修飾しなかった。6シーケンサーサイクルを分析した。

組み替えDNA法を用いることにより、いくつかの独立した基盤で側面してタンパク質分解により誘導された種と同一の機能を実現するhT<sub>F</sub>/2N分子を製造する。これは、この重要な純化タンパク質の機能的活性形態の、安定な細胞培養系における発現の初めての報告となる。

本文に記載のpNUTに基づくhT<sub>F</sub>/2N構築により、hT<sub>F</sub>/2N不足細胞系又は冗長な細胞増殖系を必要とせずに多量の組み替えタンパク質が製造された。BHK細胞は経済的火災後育成に十分適しており、培養液はバイオリファクター培養中の培養媒体上の成長特性を反映中である。数リットルの容量を有する回転瓶又は培養器のいずれかを用いることにより、従来のタンパク質を必要としてきたNMRのような方法に比して多量の組み替えタンパク質を容易に製造することができる。

Polyanion SI上で分離された非主要形態の組み替えhT<sub>F</sub>/2Nは、クレア-PAGE上の移動が主要形態より遅い(図3、パネルC)が、SDS-PAGE(図3、パネルB)上では同速度である。従って見掛けの分子量は同一であるが6Mウレア中の変性の機能的程度が異なる。タンパク質分解-誘導アボ-hT<sub>F</sub>/2Nは6Mウレア中で

T<sub>F</sub>/2Nの場合のpIはそれぞれ6.5及び6.4であった。

非主要及び主要形態の両方の組み替えhT<sub>F</sub>/2Nのアミノ末端配列分析は、血清からのhT<sub>F</sub>の場合に見いだされた結果と同一の結果を与えた(MacGillivray, R. T. A. et al. (1983) J. Biol. Chem. **258**:3549-3553)(表1)。

組み替えタンパク質のプロトNMRスペクトル(図5)は、タンパク質分解-誘導hT<sub>F</sub>/2Nのスペクトルと非常に似ている(Vaioeur, A. A. and Woodward, R. G. (1987) Biochemistry **26**:3120-3125)が、組み替えタンパク質の場合の方が非関縁は鋭い。hT<sub>F</sub>-チロシンを決定した細胞上で培養した細胞培養物から精製したタンパク質の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(図6)は、4つの十分に分離した共振を示し、2つはおそらく未分離のホルダーを有する。

表1

ヒトトランスフェリン及び組み替えヒトトランスフェリンアミノ末端一分子のアミノ末端配列

タンパク質	アミノ酸配列	参照
ヒト血清トランスフェリン	H-P-Q-K-T-V-R-G-A-T-S-	MacGillivray et al. (1983)
組み替えhT <sub>F</sub> /2N (主要)	H-P-Q-K-T-V-R-G-A-T-S-	本報告



も移動の違い種を来すことに注意してほしい(図3、パネルc、部分II及びII')。

これらのゲル上での $P_{\alpha} = hT F / 2 N$ によるアボット $hT F / 2 N$ の生成及びその阻は、 $P F L C$ 部分の収束、フレアゲル上における結合線のいくつかの損失、及び $P F L C$ 試料の仕上げの間の汚染除去の割合から生ずる。同一の $N =$ 基底配列(表1)は、シグナルペブナドが本主要及び主要形態の組み替えタンパク質の両方から除去されたことを示す。ヒト血清からの $hT F / 2 N$ の場合と同様に(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 708-713)、組み替え $hT F / 2 N$ は非-グリコシ化である。 $hT F / 2 N$ の主要形態及び本主要形態の差の理由は現在未知である。本主要形態は合併の組み替えタンパク質の5%以上とならず、通常1%以下である。従って単分組組み替え $hT F / 2 N$ (主要形態)の単離の目標は達成された。

組み替え $hT F / 2 N$ の核結合移動、 $p I$ 、 $N a D o d S O_4 - P A$ 、 $G E$ 及びウレアー $P A G E$ 上の移動、ならびにプロトンNMRスペクトルは、ナノモリシを用いたタンパク質分析によるアミノ酸 $hT F$ 一価から誘導された $hT F / 2 N$ のもの、上記の試を総じて十分合意的に一致する(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 708-713; Valicourt, A. A. and Woodward, R. C. (1987) *Biochemistry* **26**: 8120-8125)。タンパク質分析により誘導された $hT F / 2 N$ より主要形態の組み替えタンパク質は単分組出が高く(図3)、そのプロトンNMRスペクトルは鋭い

共振線を示す。非主要形態の量はNMRによる分析には不十分であった。

5. c o l i からアルカリホスファターゼ中への $m =$ フルオロシロシンの挿入の以前の研究は、タンパク質中のチロシル残基を特異的に標識するための $^{14}F$  NMRの有効性を確立した(Sykes, B. D. et al. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 469-473; Huil, W. T. and Sykes, B. D. (1974) *Biochemistry* **13**: 3431-3437)。組み替え $hT F / 2 N$ 中への $m =$ チロシンの挿入により、この細胞培養系において選択的 $^{14}F$ ラベル化が可能であり、チロシル残基の特異的NMRプローブへの誘導を与えることが証明された。この試料は非-直接組み替え体に関して上記で記載した通り、非-直接タンパク質とすべての面で同様に振舞う。多量の挿入の達成のために細胞培養条件を最適化した場合、常置性及び反活性金属を添加した時、及び $p H$ を酸化させた時の $^{14}F$  NMRスペクトルの変化は、金属結合に特異的に合致するチロシル残基の研究に有用であろう。選択的に $^{14}F$ ラベル化した腎臓アミノ酸の挿入は、日本からラジオチームに関する研究と同様の方法でタンパク質のプロトンNMRスペクトルの芳香族領域の分析を可能にするであろう(Brown-Mason, A. et al. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 1506-1509)。

11. カルボキシ基結合部位を含む組み替えトランスフェリン単分子の製造

$hT F$ のカルボキシル基結合部位のコード配列を含む $S c c R$ 制限フラグメントを、急性 $hT F$ 、 $c N A$ から単離し、PCR-指示突然変異

の特性として用いた(図2)。PCRプライマーとして用いるために2個のオリゴヌクレオチドを含めた。オリゴ1は、 $S m a I$ 制限部位をコードし、 $hT F$ の天然のシグナル配列をコードする配列が続き、アミノ酸334-341のコード配列と合わない配列が続いた。第2のオリゴヌクレオチドは $hT F$  cDNAの9' 非翻訳領域の増補体と合致し、正常な翻訳停止部位に $S m a I$ 制限配列3'を導入する。(Valicourt, P. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2762-2766)による番号付けを用いてヌクレオチド2125-2127)。Tagポリメラーゼ(perkin Elmer)を用いた25サイクルのPCR増幅は、所望のcDNAフラグメントを与え、それは $hT F$ の天然のシグナル配列をC突出部コード配列にスプライシングする。このフラグメントをその後 $S m a I$ で消化し、 $hT F / 2 N$ 発現研究の場合と同様にcNUTの6 $S m a I$ フラグメントと連結した。

11.1. 組み替え全長トランスフェリンの製造

ヒト血清トランスフェリンのためのコード配列を、上記のと肝臓ライブラリから単離した全長cDNAクローンから誘導した制限酵素消化フラグメントから組み立てた。最初のクローンの基となるプラスミド(pB-218)のユニーク制限酵素認識部位の数が限られていたため、簡便なベクター中にコード配列を導入するために一連のクローニング段階が必要であった。この過程は、cDNAの5'末端からの $H p a I / B a m H I$ フラグメントのベクターpB-218へのクローニングにより開始された(Messing, J. (1983) *Meth. Enzymol.* **115**: 20-28)。得られたプラスミドを $B a m H I$

1及び $H i n d I I I$ で消化し、ヒトトランスフェリンcDNAからの $B a m H I / H i n d I I I$ フラグメントを最初のフラグメントに挿入してクローニングした。得られたプラスミドをその後 $H i n d I I I$ 及び $P s t I$ で消化し、トランスフェリン cDNAの3'末端からの最終 $H i n d I I I / P s t I$ フラグメントをクローニングし、全一価コード配列の組み立てを完了した。 $N$ -及び $C$ -末端トランスフェリン単分子コード配列の場合に記載した通り、得られたプラスミドを $S a c I$ 及び $S p h I$ で消化すると、1個の制限フラグメントとして全一価コード配列を放出し、続いてそれを $T$  cDNAポリメラーゼ及び $d N T P$ を用いて増幅化した。その後cNUTの6 $S m a I$ フラグメントにクローニングした(Palmer, et al. (1987) *Cell* **50**: 435-448)。

プラスミドcDNAは $E. c o l i$  JM105から誘導し、酸化セリウム勾配を用いた2連続遠心段階により精製した。ペピマムスター腎臓(BHK)細胞を、10%の牛胎児血清を含む $D u l l e o c c o$ の修正 $E a g 1 e$ 培地-Ham's F-12栄養剤混合物(DMEM-F-12)(Gibco:Sigma)中で100-mmの相当たり約10<sup>7</sup>細胞に感染し、続いてSerice, P. F. et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**: 1489-1499に記載のリン酸カルシウム共沈法により100µgのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞を500µMのメトトレキサート(MTX)を含むDMEM-F-12に置き、プラスミド含有細胞を選択した。選択したら、 $0.2 g m / l$ を含むリン酸緩衝液増殖液を用い、細胞を約30%の集積度にて5個の100 mm底に、

その途中のT-175プラスコに、最後に5倍の塩液調製液(それぞれ200ml)に低能に通過させた。T-175通過の際に、フェノール赤を含むDMEM-F-12中のウシ胎児血清の代わりに血清高濃、UltraSer-G(Gibco)を1%の量で用いた。

1度塩濃度が高くなると(約100μg/ml塩度)、UltraSer-Gを含む培養地が少なくとも2回通過の間、組み換えタンパク質の製造を維持できることが見いだされた。これは発現された全一長組み換えヒト胎肝トランスフェリンの試量を非常に簡略化した。組み換えタンパク質の精製のために、収穫した培養液をフェニルメタンスルホニルフルオリド及びナトリウムアジドに関して0.01%とし、それぞれプロテアーゼ及びバクテリア成長を阻害する。凍結するトランスフェリンの量に十分な割合(ニトリロトリ酢酸)を加える。培養の体積を<10mlに減少させ、組み換えアミノ酸濃度トランスフェリン単一分子に関して記載したアニオン交換カラム(Polyanion Q1, 1×10cm)上を通過させることにより精製する。上記参照。

単離された組み換え全一長ヒト胎肝トランスフェリンはこのカラム上で、グリコール化バタンの変換によるいくつかの変異性を示す。タンパク質はNaDodSO<sub>4</sub>-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関して単分画であり、精製ヒト胎肝トランスフェリンと同等のスペクトル及びスペクトル比を示す。

#### ヒト突然変異体トランスフェリンの製造

野生型(本発明)の製造の従来の単一文字アミノ酸記号、それに続いて一次配列中の置換の位置番号、(この場合成熟タンパク質のバリンを位置1と指定する)、及びそれに続く置換残基の記号を用いることにより

500ppm間隔でコード配列の長さによって標的化した配列決定プライマーを用いたジデオキシ配列分析により確認した。その後所定のコード配列を、制限消化により放出し、平消化し、順記の通りpNUT中に挿入した。

a) 全一長ヒト胎肝トランスフェリン(hTF)及びb) アミノ-末端半分子(hTF/2N)の種々の特定部位の突然変異体のためのcDNAを含むpNUTプラスミドが構築された。これらの突然変異体は、1) ヒト胎肝トランスフェリンのC-末端半分に見られる天然に起こる突然変異に基づくD63S、2) 英国の患者からのhTFのC-末端半分に見られる天然に起こる突然変異体に基づくQ65R、c) ニフトリの卵白からのオボトランスフェリン(oTF)中のC-末端半分の野生型突然変異に基づくK206Q、d) ヒトラクトフェリン(hLTF)中の野生型突然変異に基づくH207R、及びe) 鉄結合部位の高濃濃度を調べる試みとしてのD63Cを含む。これらの構築物はすべてベクター-原核細胞の安定な形質転換物中で、10-100mgの組み換えタンパク質の量で発現された。さらにoTFのための全長cDNA及びhTF/2N-oTF/2CならびにoTF/2N-hTF/2CのためのキメラcDNAを含むpNUTプラスミドが構築された。

特定部位の突然変異体の特性には：D63S突然変異体は鉄と結合する(文献中の推測に反して)野生型タンパク質よりずっと弱々であることが示される。例えばこの突然変異体は、8Mウレアを含むPAGEGelにおける電気泳動にてその結合性を失うが、野生型はその結合性を保持している。可視スペクトルの最大は422nmにあり、野生型の470nmと対照的である。Q65R突然変異体は、野生型より鉄との

置換突然変異体を指定する。例えば位置83のアスパラギン酸残基がセリン残基により置換された変異体は、D63Sと指定される。

hTF/2N変異体の製造は、2通りの方法で行った。D81S置換体は、Nelson, R. M. and Long, G. L. (1989) Anal. Biochem. **180**:147-151の方法を用いて製造した。簡単に述べると、hTF/2Nコード配列の5'末端から約pA1/BamHIフラグメントをpUC18中にサブクローニングし、その後PCRに基づく2段階突然変異誘発法の解法として使用した。得られたDNAフラグメントをその後M13mp18中に再クローニングし、突然変異体構築物の配列をジデオキシ配列分析により確認した。その後フラグメントを、XbaI及びBamHIで消化することにより2本鎖形態の配列決定ベクターから放出し、最初のhTF/2N構築物からのBamHI/HindIIIフラグメントに接続して全長D81S-hTF/2Nコード配列を製造し、このスプライシングの忠実度を制限消化分析により確認し、その液相と同様にpNUT中にクローニングした。

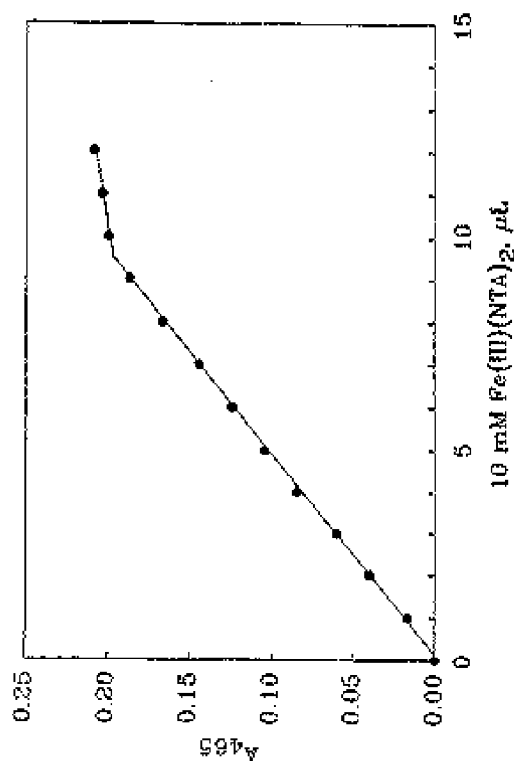
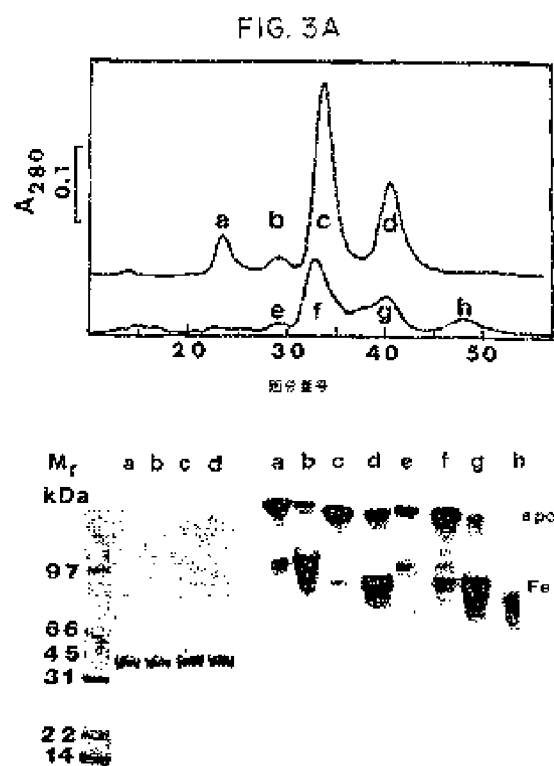
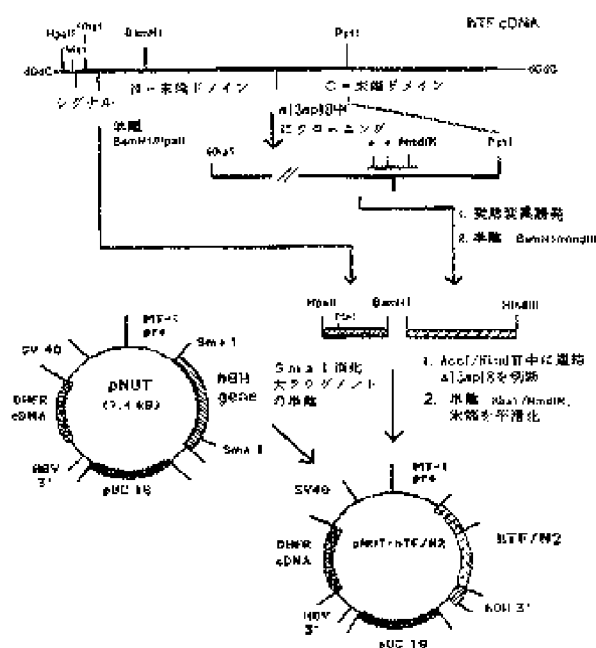
全hTF/2Nコード配列をM13mp18にサブクローニングし、その後それをオリゴヌクレオチド-指示突然変異誘発薬(Collier, M. J. and Smith, M. (1983) Meth. Enzymol. **100**:458-600)の調製として用い、dun', ung'選択性(Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:480-492)を用いることにより、置換突然変異体Q65R、D63C、K206Q及びH207Rを製造した。突然変異体の値、突然変異体配列のための全コード配列を、2

結合が弱く、470nmに可視スペクトルの最大を示す。K206Q突然変異体は、そのモデルであるoTF/2Cと同様に野生型よりずっと強く鉄と結合する。野生型鉄タンパク質の赤色は、それぞれ1mMのEDTA及びNTAを含む0.5M酢酸緩衝液、pH4.9中で非常に急速に消えるが、突然変異体は全く色を失わず、その結合性を放出するためにはpH4及び1mMのデフォロキサミンが必要である。アポ-突然変異体は、鉄との両結合が野生型タンパク質より遅いようである。この突然変異体の場合の可視スペクトルの最大は460nmにある。

全長組み換えhTFは、S<sub>0</sub>S<sub>0</sub>-PAGE上で前清-誘導タンパク質と同速度で移動する。

#### 同義変

当該技術における熟練者は、本文に記載の特定の方法に関する多数の同義物を日常的実験のみを用いて認識する、又は確かめることができるであろう。そのような同義物は本発明の範囲内であり、以下の請求の範囲に含まれると考えられる。



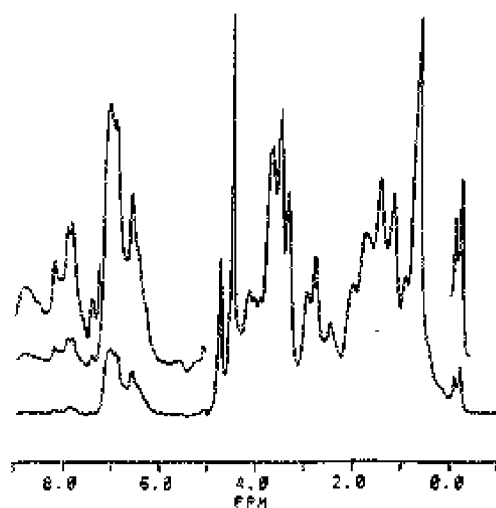


FIG. 5A

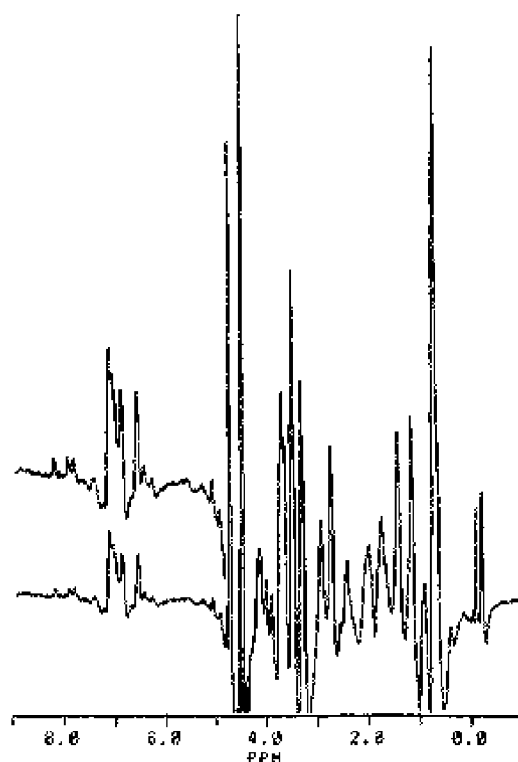


FIG. 5B

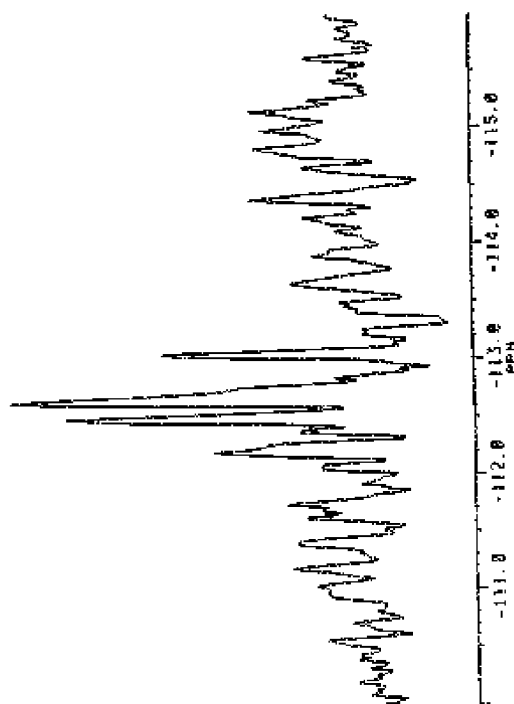


FIG. 6

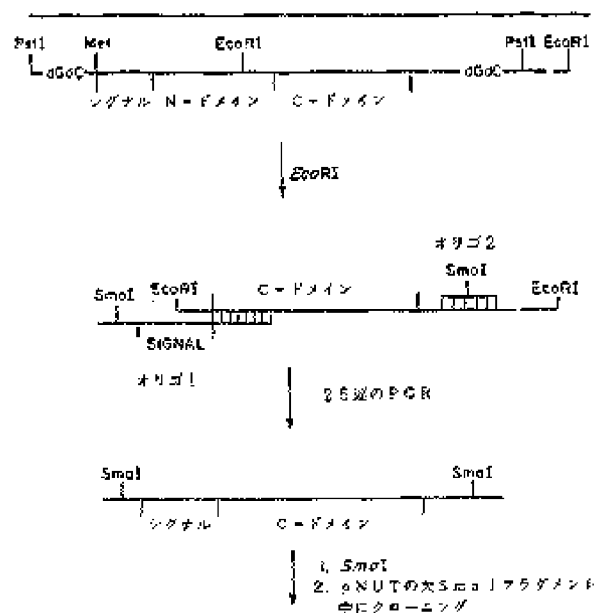


FIG. 7

平成5年8月6日

特許庁長官 麻 生 恒 雄

### 1. 特種出類の比率

PC7/US92/00928

## 2. 発明の名称

網み替えトランスフェリン、トランスフェリン半-分子、及びそれらの突然変異体

### 3. 持許退却人

送 所 アメリカ合衆国バーモント州05405バーリントン  
(番地なし)

名 称 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・アンド・ステイト・  
アグリカルチュラール・カレッジ (ほか1名)

## 4. 代理人 7107

住 所 東京都港区赤坂1丁目4番15号

日本自転車会館

店名 (6878) 井理士 小 厨 票

電話 3585-2256



## 5. 補正書の提出年月日

1 3 3 3 5 5 9 12

## 6. 確付書類の自給

(1) 補正書の写し（翻転文）

14



粘性的結成物。

9. 他の哺乳類タンパク質を含まない機能の潜性哺乳類トランスフェリンの基本的に特異な四聚物。

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱ ⑲ ⑳ ㉑ ㉒ ㉓ ㉔ ㉕ ㉖ ㉗ ㉘ ㉙ ㉚ ㉛ ㉜ ㉝ ㉞ ㉟ ㊱ ㊲ ㊳ ㊴ ㊵ ㊶ ㊷ ㊸ ㊹ ㊺ ㊻ ㊼ ㊽ ㊾ ㊿

11. a) トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を、トランスフェリンを発現させる条件下で培養し、

h) 発現されたトランスフェリンを回収する段階を含む、機械的  
前処理乳移トランスフェリンの製造法。

1.2. ベクターがプラスミドベクトルである、請求の範囲1.1に記載の方法。

13. 真核細胞がベビーハムスター腎臓細胞である、細胞の図11に記載の方法。

14. a) トランスフェリンの鉄運可能プロモーターに作動的に結合した、トランスフェリン又はその一部をコードするDNAを含む両親本ベクターを用いてトランスフェクションをれた異核細胞を培養し、

b) プロセーダーを誘導してトランスフェリンの発現を誘導し、

c) 脱炭されたトランスフェリンを回収する段階を含む、機能的活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

13. プロセーターが置留等導線能メタロチオネインプロセーターである、請求の範囲14に記載の方法。

19. 8) 請求の範囲12に記載の発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞をトランスフェリンが阻害する条件下で培養

請 求 申 請 函

2. 哺乳類トランスフェリンのアミノ末端を含む突出部とは別に基本的  
に哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含む突出部を含む、増  
進的活性トランスフェリン単一分子。

2. 少なくともネラシスフェリンの1種の突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まず、突然変異体が金属に対して天然の哺乳類トランスフェリンの結合より強い結合力を有する、機能的に活性突然変異体哺乳類トランスフェリン分子。

3. 鉄に対して天然の哺乳類トランスフェリンより強い結合力を有する、  
 銅の近圍々に記載の天然産物トランスフェリン半分子。

4. 少なくともトランスフェリンの1倍の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然の哺乳類トランスフェリンの位置を有するリン酸基が、ルタミンにより置換されている。請求の範囲5に記載の突然変異体トランスフェリン半-分子。

5. 少なくとも順式配位トランスフェリンのカルボキシル基を含むトランスフェリンの1包の突出部の金属-結合ドメインを含む、他の突出部の金属-結合ドメインを含まない順式配位トランスフェリンの機能活性半-分子を金属の濃度を幾何級以下に下げることによって非常に速く、金属キレート化治療で用いるための治療剤組成物。

6. 金属が鉄である、諸球の範囲5に記載の治具的組成物。

ア、トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンより激しく金属に結合する突然変異体である、請求の範囲5に記載の治療剤組成物。

8. トランスフェリン<sup>13</sup>単一分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置205にグルタミン残基を含む。種々の範囲7に配列の

63

b) 発見されたトランスフェリンを回収することにより製造された、基本的に他の哺乳類タンパク質を含まない機能的恒態輸乳類トランスフェリン。

**Abstract**

Form PB-1 (Rev. 7-20) (a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l) (m) (n) (o) (p) (q) (r) (s) (t) (u) (v) (w) (x) (y) (z) (aa) (ab) (ac) (ad) (ae) (af) (ag) (ah) (ai) (aj) (ak) (al) (am) (an) (ao) (ap) (aq) (ar) (as) (at) (au) (av) (aw) (ax) (ay) (az) (ba) (bb) (bc) (bd) (be) (bf) (bg) (bh) (bi) (bj) (bk) (bl) (bm) (bn) (bo) (bp) (bq) (br) (bs) (bt) (bu) (bv) (bw) (bx) (by) (bz) (ca) (cb) (cc) (cd) (ce) (cf) (cg) (ch) (ci) (cj) (ck) (cl) (cm) (cn) (co) (cp) (cq) (cr) (cs) (ct) (cu) (cv) (cw) (cx) (cy) (cz) (da) (db) (dc) (dd) (de) (df) (dg) (dh) (di) (dj) (dk) (dl) (dm) (dn) (do) (dp) (dq) (dr) (ds) (dt) (du) (dv) (dw) (dx) (dy) (dz) (ea) (eb) (ec) (ed) (ee) (ef) (eg) (eh) (ei) (ej) (ek) (el) (em) (en) (eo) (ep) (eq) (er) (es) (et) (eu) (ev) (ew) (ex) (ey) (ez) (fa) (fb) (fc) (fd) (fe) (ff) (fg) (fh) (fi) (fj) (fk) (fl) (fm) (fn) (fo) (fp) (fq) (fr) (fs) (ft) (fu) (fv) (fw) (fx) (fy) (fz) (ga) (gb) (gc) (gd) (ge) (gf) (gg) (gh) (gi) (gj) (gk) (gl) (gm) (gn) (go) (gp) (gq) (gr) (gs) (gt) (gu) (gv) (gw) (gx) (gy) (gz) (ha) (hb) (hc) (hd) (he) (hf) (hg) (hh) (hi) (hj) (hk) (hl) (hm) (hn) (ho) (hp) (hq) (hr) (hs) (ht) (hu) (hv) (hw) (hx) (hy) (hz) (ia) (ib) (ic) (id) (ie) (if) (ig) (ih) (ii) (ij) (ik) (il) (im) (in) (io) (ip) (iq) (ir) (is) (it) (iu) (iv) (iw) (ix) (iy) (iz) (ja) (jb) (jc) (jd) (je) (jf) (jg) (jh) (ji) (jj) (jk) (jl) (jm) (jn) (jo) (jp) (jq) (jr) (js) (jt) (ju) (jv) (jw) (jx) (jy) (jz) (ka) (kb) (kc) (kd) (ke) (kf) (kg) (kh) (ki) (kj) (kk) (kl) (km) (kn) (ko) (kp) (kq) (kr) (ks) (kt) (ku) (kv) (kw) (kx) (ky) (kz) (la) (lb) (lc) (ld) (le) (lf) (lg) (lh) (li) (lj) (lk) (ll) (lm) (ln) (lo) (lp) (lq) (lr) (ls) (lt) (lu) (lv) (lw) (lx) (ly) (lz) (ma) (mb) (mc) (md) (me) (mf) (mg) (mh) (mi) (mj) (mk) (ml) (mm) (mn) (mo) (mp) (mq) (mr) (ms) (mt) (mu) (mv) (mw) (mx) (my) (mz) (na) (nb) (nc) (nd) (ne) (nf) (ng) (nh) (ni) (nj) (nk) (nl) (nm) (nn) (no) (np) (nq) (nr) (ns) (nt) (nu) (nv) (nw) (nx) (ny) (nz) (oa) (ob) (oc) (od) (oe) (of) (og) (oh) (oi) (oj) (ok) (ol) (om) (on) (oo) (op) (oq) (or) (os) (ot) (ou) (ov) (ow) (ox) (oy) (oz) (pa) (pb) (pc) (pd) (pe) (pf) (pg) (ph) (pi) (pj) (pk) (pl) (pm) (pn) (po) (pp) (pq) (pr) (ps) (pt) (pu) (pv) (pw) (px) (py) (pz) (qa) (qb) (qc) (qd) (qe) (qf) (qg) (qh) (qi) (qj) (qk) (ql) (qm) (qn) (qo) (qp) (qq) (qr) (qs) (qt) (qu) (qv) (qw) (qx) (qy) (qz) (ra) (rb) (rc) (rd) (re) (rf) (rg) (rh) (ri) (rj) (rk) (rl) (rm) (rn) (ro) (rp) (rq) (rr) (rs) (rt) (ru) (rv) (rw) (rx) (ry) (rz) (sa) (sb) (sc) (sd) (se) (sf) (sg) (sh) (si) (sj) (sk) (sl) (sm) (sn) (so) (sp) (sq) (sr) (ss) (st) (su) (sv) (sw) (sx) (sy) (sz) (ta) (tb) (tc) (td) (te) (tf) (tg) (th) (ti) (tj) (tk) (tl) (tm) (tn) (to) (tp) (tq) (tr) (ts) (tt) (tu) (tv) (tw) (tx) (ty) (tz) (ua) (ub) (uc) (ud) (ue) (uf) (ug) (uh) (ui) (uj) (uk) (ul) (um) (un) (uo) (up) (uq) (ur) (us) (ut) (uu) (uv) (uw) (ux) (uy) (uz) (va) (vb) (vc) (vd) (ve) (vf) (vg) (vh) (vi) (vj) (vk) (vl) (vm) (vn) (vo) (vp) (vq) (vr) (vs) (vt) (vu) (vv) (vw) (vx) (vy) (vz) (wa) (wb) (wc) (wd) (we) (wf) (wg) (wh) (wi) (wj) (wk) (wl) (wm) (wn) (wo) (wp) (wq) (wr) (ws) (wt) (wu) (wv) (ww) (wx) (wy) (wz) (xa) (xb) (xc) (xd) (xe) (xf) (xg) (xh) (xi) (xj) (xk) (xl) (xm) (xn) (xo) (xp) (xq) (xr) (xs) (xt) (xu) (xv) (xw) (xx) (xy) (xz) (ya) (yb) (yc) (yd) (ye) (yf) (yg) (yh) (yi) (yj) (yk) (yl) (ym) (yn) (yo) (yp) (yq) (yr) (ys) (yt) (yu) (yv) (yw) (yx) (yy) (yz) (za) (zb) (zc) (zd) (ze) (zf) (zg) (zh) (zi) (zj) (zk) (zl) (zm) (zn) (zo) (zp) (zq) (zr) (zs) (zt) (zu) (zv) (zw) (zx) (zy) (zz)[illegible]

from 1973 to 1984. The mean annual precipitation was 1,410 mm.

www.sagepub.com at 09/09/2015 11:52:00 AM

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *	識別記号	序内登録番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 P 21/02	Z N A	C 9282-4 B	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
	8412 -4 B		
		C 1 2 N 5/00	B
		//(C 1 2 N 15/09	Z N A A
		C 1 2 R 1:91)	
(72)発明者	フランク、 ウォルター・デイ		
	アメリカ合衆国テキサス州75243ダラス・		
	アパートメント2262・オードリアロード		
	11991		
(72)発明者	メイソン、 アン・ビー		
	アメリカ合衆国バーモント州05445シヤー		
	ロツテ・ノースグリーンブツシユロード		
	(番地なし)		
(72)発明者	マツギリブレイ、 ロス・テイ・エイ		
	カナダ国ブイ6テイ 1テイ7・ブリテイ		
	ツシユコロンビア・バンクーバー・アリソ		
	ンロード2233・アパートメント807		
(72)発明者	ウツドワース、 ロバート・シー		
	アメリカ合衆国バーモント州05482シエル		
	バーン・ローガンレイン4		